

The role of platelet phospholipids in prothrombin and factor X activation

Citation for published version (APA):

van Rijn, J. L. M. L. (1984). *The role of platelet phospholipids in prothrombin and factor X activation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19840913jr>

Document status and date:

Published: 01/01/1984

DOI:

[10.26481/dis.19840913jr](https://doi.org/10.26481/dis.19840913jr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER VII

CONCLUSIONS AND SUMMARY

Prothrombin activation and intrinsic factor X activation are strongly stimulated by the presence of membranes containing negatively charged phospholipids and by non-enzymatic protein cofactors (factor Va for prothrombin- and factor VIIIa for factor X activation). The primary object of the studies presented in this thesis was to investigate the possibility that, during hemostasis, blood platelets provide the membrane surface required for prothrombin- and factor X activation. In chapter II we demonstrated that platelets are most active in promoting prothrombin activation, when they are stimulated by the combined action of collagen and thrombin. Unstimulated platelets or platelets stimulated with either collagen or thrombin alone were much less active in this respect. The phospholipid composition of the outer platelet surface was studied by treatment of activated and control platelets with phospholipase A_2 . Phospholipids from unstimulated platelets and from platelets stimulated by either collagen or thrombin were hardly susceptible to phospholipase A_2 . In contrast, when platelets were activated by collagen plus thrombin, up to 20% of the total amount of platelet phospholipids could be degraded by phospholipase A_2 , without significant cell lysis. The hydrolysis of glycerophospholipids comprises 25% of the phosphatidylserine-, 25% of the phosphatidylcholine- and 30% of the phosphatidylethanolamine content of the platelets stimulated with collagen plus thrombin. Using different probes to determine the phospholipid distribution over the inner- and outer leaflet of the platelet's plasma membrane, other authors reported that phosphatidylserine is almost exclusively located in the interior of unstimulated and thrombin stimulated platelets (1-4). Structural changes in the plasma membrane of platelets after stimulation with collagen plus thrombin may cause both the increased susceptibility of phospholipids to phospholipase A_2 and the exposure of phosphatidylserine required for efficient prothrombin activation.

It was expected that exposure of phosphatidylserine at the surface of platelets triggered with collagen plus thrombin would evoke the platelet procoagulant surface not only for prothrombin activation but also for intrinsic factor X activation. In chapter III we studied the role of stimulated platelets in prothrombin- and factor X activation with purified coagulation

factors and chromogenic substrates to measure rates of thrombin- and factor Xa formation. Using amounts of enzymes, substrates and protein cofactors that were saturating with respect to rates of substrate activation, the rates of prothrombin- and factor X activation found with platelets stimulated with collagen plus thrombin were increased 10 and 20 fold, respectively, as compared with unstimulated platelets. Stimulation of platelets with either collagen or thrombin alone resulted in a complete aggregation and serotonin release but induced less platelet procoagulant activity in prothrombin- and factor X activation than stimulation with collagen plus thrombin. The platelet procoagulant activity induced by collagen plus thrombin could be sedimented with the platelets upon centrifugation. Treatment of the stimulated platelets with phospholipase A₂ almost completely abolished the platelet activity in prothrombin- and factor X activation. This indicates that phospholipids in the outer leaflet of the platelet membrane are essential for the interaction of platelets with the clotting factors of the prothrombin- and factor X activating complexes.

In the assay systems used for prothrombin- and intrinsic factor X activation, the rates of thrombin- and factor Xa formation were dependent on the presence of phosphatidylserine in artificial phospholipid membranes. When low concentrations of enzymes and protein cofactors were employed for prothrombin- and factor X activation, the rates of thrombin- and factor Xa formation increased upon increasing the amount of phosphatidylserine in phospholipid vesicles. In contrast, the prothrombin- and factor X activation determined at saturating concentrations of enzymes and protein cofactors, were optimal with vesicles containing relatively low amounts of phosphatidylserine. This made the assay systems for prothrombin- and factor X activation suitable probes for the detection of various mole percentages phosphatidylserine in phospholipid bilayers. When the generation of a procoagulant surface on platelets stimulated with collagen plus thrombin was probed with the assay systems for prothrombin- and factor X activation using sub-saturating concentrations of enzymes and protein cofactors, half maximal platelet procoagulant activity was found within 2½ minutes after the onset of platelet stimulation. With saturating concentrations factor Xa and factor Va for the activation of prothrombin, higher rates of thrombin formation were observed in a later stage of platelet activation; half-maximal procoagulant activity was found 9 minutes after the addition of collagen plus thrombin to the platelets. We propose that the phosphatidylserine exposed at the surface of platelets triggered with collagen plus thrombin is not randomly distributed in the outer monolayer of the plate-

let membrane. Domains with a high phosphatidylserine density are generated shortly after platelet stimulation and are detected with the systems for prothrombin- and factor X activation using saturating and sub-saturating concentrations of clotting factors. Domains with a low phosphatidylserine density, which are formed later after triggering are probed exclusively with systems containing saturating amounts of clotting factors.

In chapter IV it was shown that with platelets, which were stimulated by the calcium ionophore A23187, 50-60 fold higher rates of prothrombin- and factor X activation were found than with non-stimulated platelets. The concentration of ionophore required for the induction of platelet procoagulant activity was similar to the concentrations required for platelet aggregation and release of ATP and factor V. The procoagulant activity, which was not due to platelet lysis, could be sedimented with the platelets by centrifugation and was completely abolished by treatment of the stimulated platelets with phospholipase A₂. Incubation of A23187 stimulated platelets with phospholipase A₂ has been shown to degrade at least half of the amount of phosphatidylserine present in platelets (3,5). We suggest that phosphatidylserine at the surface of platelets stimulated by A23187 is essential for the platelet procoagulant activity in prothrombin- and factor X activation.

In chapter V and VI studies are presented which describe the role of phospholipid bilayers and protein cofactors in the enzymatic complexes for prothrombin- and factor X activation. In previous studies (6,7) it was demonstrated that in prothrombin- and factor X activation phospholipids decrease the K_m for the respective substrates, whereas the V_{max} of the reactions is increased by the presence of their protein cofactors. As shown in chapters V and VI, the protein cofactors increase the V_{max} of prothrombin- and factor X activation not only by an increase of the k_{cat} of the reactions but also by promoting the incorporation of enzymes in the enzyme-protein cofactor-phospholipid complexes. In chapter V, the binding parameters of factor IXa for artificial bilayers consisting of phospholipids found in platelets were inferred from kinetic measurements of factor X activation in the absence and presence of factor VIIIa. Rates of factor X activation were measured at varying concentrations of factor IXa in reaction mixtures containing Ca²⁺, factor X and phospholipid vesicles. Double reciprocal plots of rates vs. factor IXa concentrations were straight lines. Maximal rates of factor X activation inferred from these plots were proportional to the phospholipid concentration, indicating that phospholipids provide kinetically functional binding sites for factor IXa. The factor IXa concentration required for half-maximal rates of

factor Xa formation was considered to be the factor IXa concentration required for the occupation of half the total amount of functional binding sites. The apparent dissociation constant so obtained varied between 0.4-1.1 μM which was not far from the reported dissociation constant obtained by direct binding studies for the binding of factor IXa to phospholipid. (8). Also when factor VIIa was present in the factor X activating reaction mixture the rates of factor Xa formation could be saturated with factor IXa. Double reciprocal plotting of rates and factor IXa concentrations revealed straight lines, indicating that single functional binding sites for factor IXa were involved. Maximal rates of factor Xa formation were proportional to the factor VIIa concentrations and independent of the phospholipid concentration present. These findings suggest that all factor VIIa was bound to phospholipid, phospholipid-bound factor VIIa being the kinetically functional binding site for factor IXa. The apparent dissociation constant determined for factor IXa binding to factor VIIa-phospholipid complexes is 50-100 fold lower than found for the apparent dissociation constant of factor IXa in the absence of factor VIIa. We conclude that factor VIIa bound at (platelet) phospholipid surfaces functions as a high affinity receptor for factor IXa. Factor VIIa increases the V_{max} of factor X activation by enhancing the k_{cat} of the reaction and by increasing the amount of phospholipid-bound factor IXa that participates in factor X activation.

Studies on the effect of factor Va and phospholipids on the formation of the enzyme-substrate complex for prothrombin activation are presented in chapter VI. Kinetic parameters of prothrombin activation were determined as a function of phospholipid composition and concentration. In the absence of factor Va and at limited amounts of phospholipid vesicles the V_{max} correlates with the binding affinity of factor Xa for the different membranes. Membranes with a high affinity for factor Xa have high V_{max} values, whereas for membranes with a low affinity a low V_{max} is found. The k_{cat} , which is defined as the V_{max} at saturating phospholipid concentration, that is when all factor Xa is bound and enzymatically active, was 2-4 min^{-1} independent of the phospholipid composition. In the presence of factor Va the k_{cat} was independent of the type and amount of acidic phospholipid in the vesicles; the value observed was 4500 min^{-1} . To achieve a V_{max} value of $\frac{1}{2} k_{\text{cat}}$, considerably less phospholipid was required in the presence of factor Va than in its absence. Apparently, in the presence of factor Va more factor Xa participates in prothrombin activation than in its absence, which is attributed to the property of factor Va to promote the binding of factor Xa to phospholipid bilayers, a phenomenon also

reported by other authors (9,10).

In the absence and presence of factor Va, the Km for prothrombin increases proportional with the phospholipid concentration. In the absence of factor Va the Km correlates with the affinity of prothrombin for the various phospholipid vesicles. Phospholipid membranes with a high affinity for prothrombin yield low Km values compared to membranes with low affinity for prothrombin, a correlation that does not exist when factor Va is present. Vesicles containing low amounts of acidic phospholipids have considerably lower Km values for prothrombin in the presence of factor Va than in its absence. The effects of factor Va on the Km for prothrombin can be explained by a model in which soluble prothrombin is the substrate for the enzymatic unit of prothrombinase that consists of a three component complex (factor Xa - factor Va - phospholipid) and in which factor Va promotes the enzyme-substrate complex formation.

REFERENCES

1. Schick, P.K., Kurica, K.B. and Chacko, G.K. (1976) J. Clin. Invest. 57, 1221-1226.
2. Chap, H.J., Zwaal, R.F.A. and van Deenen, L.L.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 467, 146-164.
3. Bevers, E.M., Comfurius, P. and Zwaal, R.F.A. (1983) Biochim. Biophys. Acta 736, 57-66.
4. Perret, B., Chap, H.J., Douste-Blazy, L. (1979) Biochim. Biophys. Acta 556, 434-446.
5. Bevers, E.M., Comfurius, P., and Zwaal, R.F.A. (1979). Thromb. Haemostas. 42, 211.
6. Rosing, J., Tans, G. Govers-Riemslog, J.W.P., Zwaal, R.F.A. and Hemker, H.C. (1980). J. Biol. Chem. 255, 274-283.
7. van Dieijen, G., Tans, G., Rosing, J. and Hemker, H.C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3433-3442.
8. Nelstuen, G.L., Kiesel, W. and DiScipio, R.G. (1978) Biochemistry 17, 2134-2138.
9. Nesheim, M.H., Taswell, J.B. and Mann, K.G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10952-10962.
10. Lindhout, T., Govers-Riemslog, J.W.P., van de Waart, P., Hemker, H.C. and Rosing, J. (1982) Biochemistry 21, 5494-5502.

De prothrombine- en intrinsieke factor X- activeringsreacties worden sterk versneld door de aanwezigheid van membranen met negatief geladen fosfolipiden en door niet-enzymatische eiwit cofactoren (factor Va voor prothrombine- en factor VIIIa voor factor X activering). De studies die in dit proefschrift zijn weergegeven, hadden tot doel de mogelijkheid te onderzoeken dat tijdens de hemostase, bloedplaatjes de membraan-oppervlakken verschaffen die nodig zijn voor prothrombine- en factor X activering.

In hoofdstuk II toonden we aan dat plaatjes de prothrombine activering het best bevorderen, als zij gestimuleerd worden door de gecombineerde werking van collageen en thrombine. Niet- gestimuleerde plaatjes of plaatjes die waren gestimuleerd met alleen collageen of thrombine waren hierin veel minder actief. De fosfolipide samenstelling van het plaatjes buiten-oppervlak werd geanalyseerd door geactiveerde- en controle plaatjes te behandelen met fosfolipase A_2 . Fosfolipiden van niet-gestimuleerde plaatjes en van plaatjes gestimuleerd door alleen collageen of thrombine waren nauwelijks gevoelig voor fosfolipase A_2 . Als daarentegen, plaatjes werden geactiveerd door collageen plus thrombine, kon 20% van de totale hoeveelheid plaatjesfosfolipiden worden afgebroken door fosfolipase A_2 , zonder significante cel lyse. De hydrolyse van glycerofosfolipiden omvat 25% van het fosfatidylserine-, 25% van het fosfatidylcholine- en 30% van het fosfatidylethanolamine gehalte van de met collageen plus thrombine gestimuleerde plaatjes. Andere auteurs (1-4) vonden, met behulp van verschillende methoden ter bepaling van de fosfolipide verdeling over de binnen- en buiten-monolaag van het plasma-membraan, dat fosfatidylserine bijna uitsluitend aanwezig is in het inwendige van het niet-gestimuleerde en thrombine- gestimuleerde plaatje. Structurele veranderingen in het plasma-membraan van plaatjes na stimulering met collageen plus thrombine zouden zowel de verhoogde gevoeligheid van fosfolipiden voor fosfolipase A_2 als het beschikbaar komen van fosfatidylserine, nodig voor een efficiënte prothrombine activering, kunnen veroorzaken.

Verwacht werd, dat door het beschikbaar komen van fosfatidylserine in het oppervlak van met collageen plus thrombine gestimuleerde plaatjes, een procoagulant oppervlak zou ontstaan dat niet alleen geschikt is voor prothrombine activering maar ook voor intrinsieke factor X activering. In hoofdstuk

III bestudeerden wij de rol van gestimuleerde plaatjes in de prothrombine- en factor X activering met behulp van gezuiverde stoffactoren en chromogene substraten voor het meten van de snelheden van thrombine- en factor Xa vorming. Met hoeveelheden enzymen, substraten en eiwit cofactoren die verzadigend waren met betrekking tot de snelheid van substraat activering, waren de snelheden van prothrombine- en factor X activering in aanwezigheid van collageen plus thrombine gestimuleerde plaatjes 10- resp. 20 maal hoger dan werd gevonden met niet-gestimuleerde plaatjes. Stimulering van plaatjes met alleen collageen of thrombine resulteerde in een volledige aggregatie en release van serotonine maar induceerde minder procoagulante activiteit in prothrombine- en factor X activering dan stimulering met collageen plus thrombine. De procoagulante activiteit van plaatjes geïnduceerd door collageen plus thrombine, kon door centrifugering, samen met de plaatjes, worden gesedimenteerd. De activiteit van plaatjes in de prothrombine- en factor X activering verdween na behandeling van de gestimuleerde plaatjes met fosfolipase A₂. Dit geeft aan dat fosfolipiden in de buiten-monolaag van het plasma-membraan essentieel zijn voor de interactie van plaatjes met de stoffactoren van de prothrombine- en factor X activerende complexen.

In de meetsystemen, die werden gebruikt voor prothrombine- en factor X activering, waren de snelheden van vorming van thrombine en factor Xa afhankelijk van de aanwezigheid van fosfatidylserine in artificieel samengestelde fosfolipide membranen. Wanneer lage concentraties enzymen en eiwit cofactoren werden gebruikt voor de activering van prothrombine en factor X, namen de snelheden van thrombine- en factor Xa vorming toe als de hoeveelheid fosfatidylserine in fosfolipide vesicles werd verhoogd. Als daarentegen verzadigende concentraties enzymen en cofactoren werden gebruikt, verliep de activering van prothrombine en factor X optimaal met vesicles die relatief lage hoeveelheden fosfatidylserine bevatten.

Dit maakte de meetsystemen voor prothrombine- en factor X activering geschikt voor het detecteren van verschillende mol-percentages fosfatidylserine in fosfolipide bilagen. Wanneer het genereren van een procoagulant oppervlak op collageen plus thrombine gestimuleerde plaatjes werd gevolgd met meetsystemen voor prothrombine- en factor X activering met niet-verzadigende concentraties enzymen en eiwit cofactoren, werd half-maximale procoagulante activiteit gevonden binnen 2½ minuut na stimulering van het plaatje. Met verzadigende concentraties factor Xa en factor Va voor de activering van prothrombine werden hogere snelheden van thrombinevorming waargenomen, echter in een later stadium van plaatjes activering; half-maximale procoagulante activiteit werd

gevonden, 9 minuten na de toevoeging van collageen plus thrombine aan de plaatjes. Een verklaring die hiervoor kan worden gegeven is, dat het fosfatidylserine, dat na stimulering beschikbaar komt op het oppervlak van plaatjes, ongelijkmatig is verdeeld in de buiten-monolaag van het plaatjesmembraan. Gebieden met een hoge fosfatidylserine dichtheid worden gevormd kort na het stimuleren van de plaatjes en worden gedetecteerd met systemen voor prothrombine- en factor X activering met verzadigende- en niet-verzadigende concentraties stolfactoren. Gebieden met een lage fosfatidylserine dichtheid, die later na de stimulering worden gevormd, kunnen uitsluitend worden aangetoond met systemen die verzadigende hoeveelheden stolfactoren bevatten. In hoofdstuk IV werd aangetoond dat met plaatjes, die waren gestimuleerd door calcium-ionofoor A23187, snelheden werden gevonden voor prothrombine- en factor X activering die 50-60 maal hoger waren dan met niet-gestimuleerde plaatjes. De ionofoor concentratie die nodig was voor het induceren van plaatjes procoagulante activiteit kwam overeen met de concentratie die nodig was voor plaatjes aggregatie en release van ATP en factor V. De procoagulante activiteit, die niet kon worden toegeschreven aan cel lyse, kon samen met de plaatjes worden gesedimenteerd door centrifugatie en verdween na behandeling van de gestimuleerde plaatjes met fosfolipase A_2 . Eerder was aangetoond dat het incuberen van A23187-gestimuleerde plaatjes met fosfolipase A_2 resulteerde in de afbraak van tenminste de helft van de hoeveelheid fosfatidylserine, die in plaatjes aanwezig is (3,5). Wij stellen voor dat fosfatidylserine op het oppervlak van met A23187 gestimuleerde plaatjes, essentieel is voor de plaatjes procoagulante activiteit in de activering van prothrombine en factor X.

In hoofdstuk V en VI zijn studies gepresenteerd naar de rol van fosfolipide bilagen en eiwit cofactoren in de enzymatische complexen voor prothrombine- en factor X activering. In eerdere experimenten (6,7) werd aangetoond dat, in de prothrombine- en factor X activering, de K_m voor de respectievelijke substraten wordt verlaagd door fosfolipiden, terwijl de V_{max} van de reacties wordt verhoogd door de aanwezigheid van hun eiwit cofactoren. In de hoofdstukken V en VI wordt aangetoond dat de eiwit cofactoren de V_{max} van prothrombine- en factor X activering niet alleen verhogen door een verhoging van de k_{cat} van de reacties, maar tevens door het bevorderen van de inbouw van enzymen in enzym - eiwit cofactor - fosfolipide complexen. In hoofdstuk V werden de bindingsparameters van factor IXa voor bilagen bestaande uit fosfolipiden die ook in het plaatje aanwezig zijn, afgeleid van kinetische metingen van de activering van factor X in aan- en afwezigheid van factor VIIa. De snelheden van factor Xa vorming werden gemeten bij verschillende concentraties factor

IXa, in reactie mengsels die Ca^{2+} , factor X en fosfolipiden bevatten. Rechte lijnen werden gevonden wanneer de reciproke snelheden werden uitgezet tegen de reciproke factor IXa concentraties. De maximale snelheden van factor X activering die met behulp van deze plots werden bepaald, waren evenredig met de fosfolipide concentratie, hetgeen erop wijst dat fosfolipiden de kinetisch functionele bindingsplaatsen leveren voor factor IXa. De concentratie factor IXa die nodig is om half-maximale snelheden van factor Xa vorming te verkrijgen, werd beschouwd als de factor IXa concentratie die nodig was voor de bezetting van de helft van alle functionele bindingsplaatsen. De zo verkregen, kinetisch afgeleide, dissociatie constante varieerde tussen 0.4-1.1 μM en was vergelijkbaar met de in de literatuur gerapporteerde dissociatie constante, die werd gevonden met directe bindingsstudies (8).

Ook als factor VIIa aanwezig was in het reactie mengsel voor factor X activering, was het mogelijk de snelheden van factor Xa vorming te verzadigen met factor IXa. Het dubbel reciprook uitzetten van snelheden en factor IXa concentraties leverde rechte lijnen op, hetgeen wijst op de betrokkenheid van één soort functionele bindingsplaats voor factor IXa. De maximale snelheden van factor Xa vorming waren evenredig met de factor VIIa concentraties en onafhankelijk van de fosfolipide concentratie.

Deze waarnemingen suggereren dat alle factor VIIa gebonden was aan fosfolipiden en dat de fosfolipide-gebonden factor VIIa de kinetisch functionele bindingsplaats is voor factor IXa. De kinetisch bepaalde dissociatie constante, die werd gevonden voor de binding van factor IXa aan factor VIIa-fosfolipide complexen, is 50-100 maal lager dan die werd gevonden voor factor IXa in afwezigheid van factor VIIa. Wij concluderen dat factor VIIa, dat gebonden is aan (plaatjes)fosfolipide oppervlakken, functioneert als een receptor met hoge affiniteit voor factor IXa. Factor VIIa verhoogt de V_{max} van factor X activering door het verhogen van de k_{cat} van de reactie en door het vergroten van de hoeveelheid factor IXa dat aan fosfolipiden gebonden is en dat deelneemt aan de activering van factor X.

Studies naar het effect van factor Va en fosfolipiden op de vorming van het enzym-substraat complex voor de activering van prothrombine zijn gepresenteerd in hoofdstuk VI. De kinetische parameters van prothrombine activering werden bepaald als functie van de fosfolipide concentratie en fosfolipide samenstelling. In afwezigheid van factor Va en bij beperkte hoeveelheid fosfolipide vesicles, correleert de V_{max} met de bindings affiniteit van factor Xa voor de verschillende membranen. Membranen met een hoge affiniteit voor factor Xa geven hoge V_{max} waarden, terwijl voor membranen met een lage affiniteit een

lage V_{max} wordt gevonden. De k_{cat} , die is gedefinieerd als de V_{max} bij verzadigende fosfolipide concentratie, waarbij alle factor Xa gebonden is en enzymatisch actief, was $2-4 \text{ min}^{-1}$ onafhankelijk van de fosfolipide samenstelling. In aanwezigheid van factor Va was de k_{cat} onafhankelijk van het soort en de hoeveelheid zure fosfolipiden in de vesicles; de gevonden waarde was 4500 min^{-1} . Om een V_{max} waarde te vinden gelijk aan $\frac{1}{2} k_{cat}$, was aanzienlijk minder fosfolipide nodig in aanwezigheid van factor Va dan in afwezigheid hiervan, hetgeen wordt toegeschreven aan de eigenschap van factor Va om de binding van factor Xa aan fosfolipide bilagen te bevorderen; een eigenschap die ook is gerapporteerd door andere auteurs (9,10).

Zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van factor Va, stijgt de K_m voor prothrombine proportioneel met de fosfolipide concentratie. In afwezigheid van factor Va correleert de K_m met de affiniteit van prothrombine voor de verschillende fosfolipide vesicles. Fosfolipide membranen met een hoge affiniteit voor prothrombine geven lage K_m waarden vergeleken met membranen met een lage affiniteit voor prothrombine, een correlatie die niet bestaat als factor Va aanwezig is. Vesicles met lage percentages zure fosfolipiden hebben aanzienlijk lagere K_m waarden voor prothrombine in aanwezigheid van factor Va dan in afwezigheid hiervan.

De effecten van factor Va op de K_m voor prothrombine kunnen worden verklaard met een model waarin prothrombine in de oplossing het substraat is voor de enzymatische unit van prothrombinase, die bestaat uit drie componenten (factor Xa - factor Va - fosfolipide) en waarin factor Va de enzym-substraat complexvorming bevordert.

REFERENTIES

1. Schick, P.K., Kurica, K.B. and Chacko, G.K. (1976) *J.Clin.Invest.* 57, 1221-1226.
2. Chap, H.J., Zwaal, R.F.A. and van Deenen, L.L.M. (1977) *Biochim.Biophys. Acta* 467, 146-164.
3. Bevers, E.M., Comfurius, P. and Zwaal, R.F.A. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* 736, 57-66.
4. Perret, B., Chap, H.J., Douste-Blazy, L. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 556, 434-446.
5. Bevers, E.M., Comfurius, P. and Zwaal, R.F.A. (1979) *Thromb.Haemostas.* 42, 211.
6. Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J.W.P., Zwaal, R.F.A. and Hemker, H.C. (1980) *J.Biol.Chem.* 255, 274-283.
7. van Diejen, G., Tans, G., Rosing, J. and Hemker, H.C. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 3433-3442.

8. Neiseestuen, G.L., Kiesel, W. and DiScipio, R.G. (1978) *Biochemistry* 17, 2134-2138.
9. Nesheim, M.H., Taswell, J.B. and Mann, K.G. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 10952-10962.
10. Lindhout, T., Govers-Riemslog, J.W.P., van de Waart, P., Hemker, H.C. and Rosing, J. (1982) *Biochemistry* 21, 5494-5502.